

Kelahiran Anak Sapi Hasil Fertilisasi secara *in Vitro* dengan Sperma Hasil Pemisahan

E. M. Kaiin, S. Said & B. Tappa

Bidang Biologi Sel dan Jaringan, Pusat Penelitian Bioteknologi LIPI
Jl. Raya Bogor km.46 Cibinong 16911, e-mail: ekayantimk@yahoo.com
(Diterima 06-07-2007; disetujui 02-10-2007)

ABSTRACT

The aim of this study was to know the viability of embryo after fertilized *in vitro* with frozen separated sperm (sexing sperm). Eleven frozen embryos were transferred to six Bali cow and five FH cow recipients. Two Bali cow recipients were positively pregnant but only one born as male calf which was appropriate with sex of straw being inseminated (Y sperm). One FH cow recipient was also pregnant but aborted in 2.5 months of pregnancy. It was concluded that embryo resulted from *in vitro fertilization* (IVF) with sexing sperm could grow and develop to be a calf which was appropriate with the sex of straw inseminated.

Key words: sperm sexing, IVF, embryo transfer, Bali cow

PENDAHULUAN

Pengembangan peternakan di Indonesia khususnya dalam rangka meningkatkan populasi ternak, untuk mencukupi kebutuhan konsumsi dalam negeri, perlu didukung oleh berbagai faktor. Beberapa teknologi reproduksi diaplikasikan untuk meningkatkan angka kebuntingan dan kelahiran anak. Teknologi inseminasi buatan (IB) sudah banyak diaplikasikan oleh peternak di Indonesia. Demikian pula halnya dengan teknologi transfer embrio (TE) yang sudah mulai diperkenalkan di Indonesia pada tahun 1987 (Toelihere, 1993). Puslitbang Bioteknologi LIPI (sekarang: Puslit Bioteknologi LIPI) mulai mengembangkan teknologi ini pada tahun 1991 dengan lahirnya anak-anak sapi Brangus hasil

transfer embrio pada tahun 1992 (Tappa *et al.*, 1992). Selain itu, kelahiran pertama anak sapi perah Hongarian hasil transfer embrio yang dititipkan pada induk resipien sapi potong Brangus (Tappa *et al.*, 1994) merupakan langkah awal diaplikasikannya TE di beberapa daerah di Indonesia melalui kegiatan kerjasama oleh Puslit Bioteknologi LIPI dengan Dinas Peternakan Daerah.

Teknologi fertilisasi secara *in vitro* (FIV) pada ternak, khususnya sapi merupakan salah satu usaha memanfaatkan limbah ovari dari induk sapi betina yang dipotong di Rumah Potong Hewan. FIV ini diharapkan dapat memproduksi embrio sapi dalam jumlah massal untuk dititipkan pada induk resipien, sehingga dapat diperoleh ternak dalam jumlah banyak untuk meningkatkan populasi ternak di Indonesia.

Teknologi pemisahan sperma betina (X) dan jantan (Y) pada saat ini telah dikembangkan. Teknik ini dapat digunakan untuk mendapatkan anak dengan jenis kelamin sesuai harapan. Aplikasi teknologi ini dalam industri peternakan sapi akan sangat membantu dalam pengadaan bibit sapi potong atau sapi perah. Peternak sapi potong akan lebih mengharapkan kelahiran anak sapi jantan untuk penggemukan, sedangkan peternak sapi perah mengharapkan lebih banyak anak sapi betina yang lahir untuk produksi susu. IB dengan menggunakan *straw* jantan (Y) dapat mempercepat pemenuhan kebutuhan akan bibit jantan dibandingkan dengan jika IB menggunakan *straw* biasa (tanpa pemisahan). Hal tersebut dapat memenuhi kebutuhan akan daging karena akan lebih banyak anak sapi jantan untuk penggemukan.

Metode pemisahan sperma sapi yang sudah banyak digunakan di luar negeri menggunakan *flow cytometry* yang secara akurat dapat mengukur kandungan DNA sperma sehingga dapat dibedakan antara sperma pembawa jenis kelamin betina (X) atau pembawa jenis kelamin jantan (Y). Selain itu terdapat metode pemisahan sperma lainnya seperti sedimentasi, elektroforesis, filtrasi Sephadex G-50, sentrifugasi, kolom albumin (BSA) dan metode lainnya (Garner, 2001). Akurasi hasil *sexing* dengan metode *flow cytometry* diperkirakan mencapai 90% (Seidel & Garner, 2002), sedangkan Johnson & Seidel (1999) menyatakan bahwa dengan *sexing* sperma menggunakan *flow cytometry* dapat diperoleh 85%-95% kelahiran anak dengan jenis kelamin sesuai. Harga peralatan *flow cytometry* yang cukup mahal mendorong pengembangan teknik yang lebih sederhana yaitu dengan metode kolom albumin dengan menggunakan serum albumin sapi (BSA). Berdasarkan penelitian sebelumnya diperoleh bahwa konsentrasi BSA 5%-10% memberikan hasil optimum dalam memisahkan sperma X dan Y pada sapi penelitian (Kaiin *et al.*, 2003).

Penggunaan sperma hasil pemisahan pada fertilisasi *in vitro* dapat membuktikan bahwa embrio yang berkembang merupakan embrio jantan jika difertilisasi dengan sperma Y dan embrio betina jika difertilisasi dengan sperma X. Teknik FIV yang menggunakan sperma hasil pemisahan dapat memproduksi embrio dengan jenis kelamin betina atau jantan, kemudian embrio-embrio yang diperoleh ditransfer ke induk resipien untuk mendapatkan anak dalam jumlah banyak dengan jenis kelamin sesuai harapan (jantan atau betina). Cran *et al.* (1993) telah melakukan FIV dengan sperma hasil pemisahan X (kemurnian 79%) dan sperma Y (kemurnian 70%). Sebanyak 9 embrio ditransfer, masing-masing 2 embrio dan diperoleh 4 ekor induk bunting dan melahirkan 3 anak sapi jantan dan 3 anak sapi betina, hasil ini sesuai dengan jenis kelamin sperma yang digunakan dan *sexing* embrio blastosis dengan PCR sebelumnya (Cran *et al.*, 1995).

Diharapkan dengan aplikasi teknologi pemisahan sperma ini dapat membantu pembangunan peternakan di Indonesia, terutama dalam mengatasi ketergantungan impor sapi dan produk olahannya dari luar negeri. Penelitian dilakukan bertujuan untuk menguji kemampuan fertilisasi sperma hasil pemisahan secara *in vitro* dan menguji viabilitas embrio yang dihasilkan setelah melalui kultur, pembekuan dan transfer embrio.

MATERI DAN METODE

Koleksi Ovarium dan Pengumpulan Oosit

Ovarium sapi BX dikoleksi dari sapi yang dipotong di RPH dan dipisahkan bagian-bagian lain seperti lemak, oviduk dan jaringan lain. Ovarium dibawa ke laboratorium menggunakan termos berisi larutan NaCl fisiologis yang ditambah dengan antibiotik dengan temperatur 25-30°C.

Ovarium kemudian dicuci kembali dengan NaCl fisiologis hangat dan dikeringkan dengan kertas tisu steril. Media aspirasi

yang terdiri atas media DPBS (GIBCO™) yang ditambah dengan 3% *calf serum* (CS, GIBCO™) dihangatkan terlebih dahulu di dalam *water bath* 37°C. Oosit diaspirasi dengan menggunakan *syringe* 10 ml dengan jarum ukuran 18 G yang berisi sedikit media aspirasi. Folikel ovarium yang berukuran 1-5 mm diaspirasi, dan cairan yang tertampung di dalam *syringe* dimasukkan ke dalam cawan petri steril. Pencarian oosit dilakukan di bawah mikroskop stereo.

Maturasi Oosit, Fertilisasi, Kultur *in Vitro*

Oosit yang terkoleksi dan mempunyai kualitas sangat baik dan baik (A dan B) kemudian dicuci dalam media maturasi TCM 199 (GIBCO™) + 10 % *fetal calf Serum* (FCS, GIBCO™) dan ditambahkan hormon E2 (1µg/ml), hCG (10µg/ml) dan FSH (10µg/ml). Oosit tersebut dimasukkan ke dalam 50 µl spot media maturasi yang sebelumnya telah diekuilibrasikan di dalam inkubator CO₂ 5%, temperatur 38 °C dan dikultur selama 22-24 jam (Margawati *et al.*, 2000)

Sebelum dilakukan fertilisasi, sperma beku X atau Y sapi PO yang telah dipisahkan dengan menggunakan kolom BSA 5-10% (Kaiin *et al.*, 2003) di-*thawing* dan masing-masing diperiksa motilitasnya. Motilitas sperma $\geq 40\%$ digunakan untuk memfertilisasi oosit secara *in vitro*. Sperma X atau Y yang telah di-*thawing* kemudian dimasukkan ke dalam tabung sentrifugasi, ditambah media *semen washing solution* (SWS) yang terdiri atas media Brackett Oliphant (BO) yang mengandung kafein dan heparin, kemudian sperma disentrifugasi dengan kecepatan 1800 rpm selama 5 menit pada temperatur 27°C. Supernatan dibuang, kemudian endapan sperma (0,5 ml) ditambah dengan media *semen dilution solution* (SDS, yang terdiri atas media BO dan BSA 20 mg/ml) sampai konsentrasi 1×10^6 / ml. Spot berisi 100 µl SDS berisi sperma X atau Y dibuat di dalam cawan petri, kemudian ditutup dengan *mineral oil* dan diinkubasi untuk kapasitas

sperma selama 1 jam. Setelah itu dilakukan pencucian oosit yang telah dimaturasi dengan menggunakan media *oocyte washing solution* (OWS, yang terdiri atas media BO dan BSA 10 mg/ml). Oosit yang telah dicuci kemudian ditempatkan ke dalam spot SDS + sperma (10 oosit/ spot) dan dikultur selama 6-7 jam dalam inkubator CO₂ (Kaiin *et al.*, 2004).

Oosit yang difertilisasi kemudian dicuci dengan media kultur CR1aa + 5% FCS sambil dihilangkan sel-sel kumulusnya dengan menggunakan pipet. Zigot kemudian dimasukkan ke dalam spot media kultur yang kemudian dimasukkan ke dalam inkubator CO₂ 5%, temperatur 38°C. Pengamatan perkembangan embrio dari tahap 2 sel sampai morula/blastosis dilakukan setiap 24 jam selama 6-7 hari (Margawati *et al.*, 2000; Kaiin *et al.*, 2004).

Pembekuan Embrio

Embrio yang mencapai tahap morula atau blastosis dalam kultur *in vitro* kemudian dicuci dalam media DPBS mengandung 20% FCS, kemudian dipindahkan berturut-turut ke dalam media yang mengandung gliserol 3,3%; 6,7% sampai 10% masing-masing selama 10 menit. Embrio dan gliserol dalam volume sesedikit mungkin kemudian dimasukkan ke dalam *straw* bersama dengan kolom-kolom media berisi sukrosa yang berfungsi sebagai media pencuci gliserol pada saat *thawing*. Setelah itu, *straw* yang berisi embrio tersebut dibekukan dengan menggunakan mesin *programmable freezer* ET-1 (FHK) dengan penurunan temperatur secara bertahap 1°C/menit. Selanjutnya pada saat mencapai temperatur -30°C, *straw* dimasukkan dan disimpan dalam tangki nitrogen cair (temperatur -196°C).

Program Transfer Embrio

Seleksi induk sapi yang akan digunakan sebagai ternak resipien dilakukan dengan memeriksa keadaan alat reproduksinya. Sapi dengan kondisi reproduksi yang memenuhi

syarat digunakan sebagai ternak resipien. Setelah itu sapi diprogram dan disinkronisasi berahinya dengan penyuntikan PGF2 α (Prosolvin, Intervet) dengan dosis 2 ml/ekor secara intra muskular. Transfer embrio menggunakan embrio beku hasil FIV dengan sperma hasil pemisahan dilakukan pada hari ke 6 setelah berahi pada induk resipien sapi Bali di Kabupaten Konawe, Sulawesi Tenggara dan resipien sapi FH di kandang ternak Puslit Bioteknologi LIPI di Cibinong. *Straw* embrio beku di-*thawing* dalam air hangat 37° C kemudian langsung ditransfer ke induk resipien dengan menggunakan *gun* transfer.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Sebelum melakukan fertilisasi secara *in vitro*, dilakukan terlebih dahulu pengujian kualitas sperma beku hasil pemisahan (sperma X dan Y). Hasil pengamatan terhadap kualitas sperma beku tersebut terdapat pada Tabel 1.

Motilitas sperma hasil pemisahan beku setelah dicairkan kembali mencapai motilitas sebesar 45% (sperma X), 45% (sperma Y) dan 50% (sperma yang tidak dipisahkan). Sperma beku yang digunakan dalam penelitian ini memenuhi syarat sesuai standar *post thawing motility* (PTM) yaitu lebih besar atau sama dengan 40% (Direktorat Pembibitan, 2000). Kemampuan fertilisasi sperma terhadap oosit diukur berdasarkan motilitas atau daya gerak sperma mencapai oosit yang berada di dalam

saluran reproduksi betina (Salisbury & Van Demark, 1985).

Menurut Toelihere (1993), selama proses pembekuan sebanyak 20%-80% sperma akan mati. Rendahnya persentase sel hidup akan memperkecil peluang sperma untuk dapat memfertilisasi oosit. Penurunan motilitas setelah proses kriopreservasi sperma sebesar 50% merupakan hal yang umum terjadi pada proses pembekuan sperma mamalia. Motilitas sperma setelah *thawing* yang digunakan pada penelitian ini masih dalam kondisi layak IB (motilitas lebih besar atau sama dengan 40%).

Berdasarkan pewarnaan terhadap apusan sel sperma yang telah dipisahkan menunjukkan bahwa persen sperma X sebesar 71,2% dan sperma Y sebesar 76,6% (Kaiin *et al.*, 2003). Pembuktian dilakukan melalui pengujian, baik secara *in vivo* maupun *in vitro*. Uji secara *in vivo* dengan cara menginseminasikan sperma terhadap induk resipien IB, dan uji secara *in vitro* dengan menginseminasikan sperma tersebut pada proses fertilisasi secara *in vitro* sehingga terbentuk embrio yang mencapai tahap morula dan blastosis untuk ditransfer ke induk resipien dengan cara transfer embrio. Cara lain yang dapat digunakan untuk menentukan jenis kelamin embrio adalah metode karyotiping, tetapi karena jumlah embrio hasil fertilisasi *in vitro* yang terbatas maka pengamatan jenis kelamin embrio dengan metode karyotiping tidak dilakukan. Perkembangan embrio hasil fertilisasi *in vitro* dengan menggunakan sperma X dan Y hasil pemisahan terdapat pada Tabel 2.

Jumlah oosit yang dapat membelah menjadi embrio tahap 2 sel (Gambar 1a) pada oosit yang difertilisasi dengan sperma X (45,8%) dan sperma Y (39,6%) cenderung lebih rendah dibandingkan dengan oosit yang difertilisasi dengan sperma yang tidak dipisahkan (51,5%). Hal ini diduga berkaitan dengan kualitas sperma X dan Y hasil pemisahan yang mempunyai motilitas dan kualitas individu sperma yang cenderung lebih rendah, serta kualitas oosit dan media kultur yang digunakan (Tabel 1).

Tabel 1. Kualitas sperma beku hasil pemisahan setelah *thawing* (%)

Parameter	K	X	Y
Motilitas	50 \pm 2,23	45 \pm 2,23	45 \pm 5,47
Persentase sel hidup	61 \pm 2,94	50 \pm 2,88	47 \pm 1,63
Abnormalitas	13 \pm 0,57	13 \pm 1,29	13,5 \pm 0,32

Keterangan: K = sperma yang tidak dipisahkan
X = sperma betina
Y = sperma jantan

Tabel 2. Perkembangan embrio hasil fertilisasi *in vitro* dengan menggunakan sperma X atau Y hasil pemisahan

Sperma	Jumlah oosit FIV	Jumlah embrio 2 sel (%)	Jumlah embrio tahap morula dan blastosis (%)
Tanpa pemisahan (kontrol)	200	103 (51,5)	54 (52,4)
X	214	98 (45,8)	42 (42,9)
Y	222	88 (39,6)	36 (40,9)

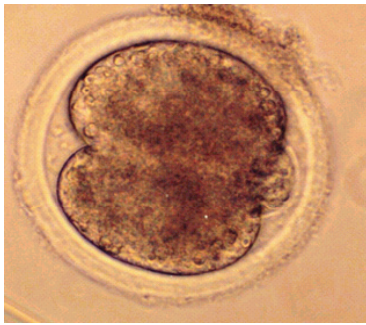
Penggunaan sperma hasil pemisahan dalam fertilisasi *in vitro* masih mampu memfertilisasi oosit dan menghasilkan embrio tahap 2 sel. Perkembangan embrio tahap 2 sel selanjutnya mencapai tahap morula (Gambar 1b) dan blastosis tidak menunjukkan adanya perbedaan yang nyata antara oosit yang difertilisasi dengan sperma X (42,9%), sperma Y (40,9%) maupun sperma yang tidak dipisahkan (52,4%). Proses perkembangan embrio pada tahap 2 sel mencapai tahap morula dan blastosis lebih banyak dipengaruhi oleh proses kultur embrio. Embrio tahap morula dan blastosis yang dihasilkan semuanya disimpan dalam keadaan beku. Program transfer embrio dilakukan pada sapi Bali di Kabupaten

Konawe, Sulawesi Tenggara, menggunakan 6 embrio beku yang ditransfer ke 6 ekor resipien milik peternak (masing-masing 1 embrio per resipien), sedangkan di Cibinong sebanyak 5 embrio ditransfer ke 5 ekor induk sapi FH. Hasil transfer embrio dengan menggunakan embrio hasil fertilisasi *in vitro* dengan sperma hasil pemisahan pada induk resipien terdapat pada Tabel 3.

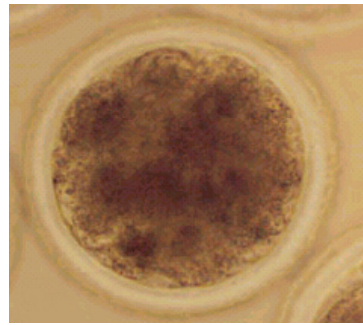
Berdasarkan data di atas, diperoleh hasil bahwa embrio tahap morula hasil fertilisasi dengan sperma pembawa kelamin jantan (Y) berhasil terimplantasi dan berkembang dalam uterus resipien. Satu ekor anak sapi lahir berkelamin jantan dari dua resipien yang bunting di Konawe. Hal tersebut sesuai

Tabel 3. Transfer embrio hasil FIV menggunakan sperma hasil pemisahan

Lokasi	Jumlah embrio hasil FIV	Jumlah resipien	Hasil pemeriksaan kebuntingan	Keterangan
Cibinong	1 morula X	1	1 positif bunting	abortus 2,5 bln, jenis kelamin tidak terdeteksi
	2 morula Y	2	tidak bunting	
	1 blastosis X	1	tidak bunting	
	1 blastosis Y	1	tidak bunting	
Konawe	2 morula X	2	tidak bunting	1 lahir anak jantan (tanggal 1 Oktober 2004); 1 induk bunting 7 bln dijual peternak (data tidak terlacak)
	2 morula Y	2	2 positif bunting	
	2 blastosis Y	2	tidak bunting	
Jumlah	11	11	3 positif bunting	1 lahir, 1 abortus, 1 data hilang



(a) embrio 2 sel



(b) morula

Gambar 1. Embrio hasil fertilisasi *in vitro* dengan sperma hasil pemisahan

dengan jenis kelamin sperma yang digunakan pada saat fertilisasi *in vitro* (Gambar 2). Data kelahiran anak satu ekor resipien lainnya tidak terlacak karena dijual oleh peternak pada umur kebuntingan 7 bulan. Program transfer embrio di Cibinong hanya menghasilkan 1 ekor induk resipien FH yang bunting, walaupun akhirnya terjadi abortus pada umur kebuntingan 2,5 bulan dan jenis kelaminnya tidak teramati karena fetus sudah hancur sewaktu dikeluarkan.

Perkembangan anak hasil TE setelah berumur 11 bulan memiliki bobot badan lebih besar dari induknya (Gambar 2). Hasil anak sapi jantan yang diperoleh tersebut membuktikan murni hasil TE karena anak yang dihasilkan sesuai dengan jenis sperma dan oosit yang

digunakan pada saat fertilisasi *in vitro* yaitu silangan sapi Peranakan Ongole, PO (sperma) dengan sapi Brahman Cross, BX (oosit) yang secara genetik jauh berbeda dengan induknya yaitu sapi Bali.

Penelitian yang dilakukan Hoshi (2003) berhasil melakukan transfer embrio dengan menggunakan embrio hasil produksi *in vitro* dalam media tanpa serum dengan hasil yang lebih baik dibandingkan dengan embrio yang diproduksi dalam media yang mengandung serum. Keberhasilan kebuntingan pada saat pemeriksaan kebuntingan adalah sebesar 39,6% pada resipien yang ditransfer dengan embrio yang diproduksi secara *in vitro* tanpa serum dan 32,8% pada embrio yang diproduksi dalam



Gambar 2. Induk sapi Bali dan anak sapi (jenis PO x BX) hasil FIV dengan sperma hasil pemisahan dan transfer embrio

media mengandung serum. Tappa *et al.* (1994) melaporkan bahwa keberhasilan kebuntingan pada induk sapi yang ditransfer embrio adalah sebesar 45,5%. Keberhasilan kebuntingan resipien IB pada sapi perah yang diinseminasi dengan sperma sexing sapi Hongarian adalah sebesar 81% (17/21) dengan S/C 1, 37 (Said *et al.*, 2005).

KESIMPULAN

Embrio hasil fertilisasi *in vitro* sel telur dengan sperma hasil pemisahan mampu tumbuh mencapai tahap blastosis dan morula. Aplikasi teknologi ini masih menghadapi kendala, khususnya dalam tahap terakhir pada saat pembekuan dan transfer embrio.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih kami sampaikan kepada Gunawan, Nova, Edy, H Yanwar dan Disnak Kab. Konawe atas bantuannya selama penelitian ini berlangsung.

DAFTAR PUSTAKA

- Direktorat Pembibitan.** 2000. Petunjuk teknis pengawasan mutu bibit ternak. Direktorat Pembibitan. Direktorat Jenderal Peternakan. Departemen Pertanian, Jakarta.
- Cran, D.G., L.A. Johnson, N.G.A. Miller, D. Cochrane & C. Polge.** 1993. Production of bovine calves following separation of X and Y- chromosome bearing sperm and in vitro. *Vet. Rec.* 132 : 40-41.
- Cran, D.G., L.A. Johnson & C. Polge.** 1995. Sex preselection in cattle: A field trial. *Vet. Rec.* 136 : 495-496.
- Garner, D.L.** 2001. Sex-sorting mammalian sperm: Concept to application in animals. *Journal of Andrology* 22 : 519-526.
- Hoshi, H.** 2003. In vitro production of bovine embryos and their application for embryo transfer. *Theriogenology* 59 : 675 -685.
- Johnson, L.A. & G.E. Seidel, Jr.** 1999. Current status of sexing mammalian spermatozoa. *Theriogenology* 52 : 1267 – 1484.
- Kaiin, E.M., B. Tappa, S. Said, F. Afiati, M. Gunawan & N.D. Yanthi.** 2003. Aplikasi bioteknologi untuk produksi bibit yang sudah diketahui jenis kelaminnya. Laporan Teknik Proyek Penelitian Bioteknologi. Puslit Bioteknologi LIPI. Hlm. 96-116.
- Kaiin, E.M., M. Gunawan, S.Said & B.Tappa.** 2004. Fertilisasi dan perkembangan oosit sapi hasil IVF dengan sperma hasil pemisahan. Prosiding Seminar Nasional Teknologi Peternakan dan Veteriner. Puslitbang Peternakan, Bogor. Hlm. 21-25.
- Margawati, E.T., E.M. Kaiin, K.Eriani, N.D. Yanthi & Indriawati.** 2000. Pengaruh media IVM dan IVC pada perkembangan embrio sapi secara *in vitro*. *Jurnal Ilmu Ternak dan Veteriner* 5 : 229-233.
- Said, S., E.M. Kaiin & B. Tappa.** 2005. Produksi anak sapi potong dan perah berjenis kelamin sesuai harapan. Prosiding Seminar Nasional Industri Peternakan Modern. Puslit Bioteknologi. Mataram. Hlm.. 209-216.
- Salisbury, G.W. & H.L. Van Demark.** 1985. Fisiologi Reproduksi dan Inseminasi Buatan pada Sapi. Terjemahan: J. Djanuar. Gajah Mada University Press, Yogyakarta.
- Seidel, G.E.Jr. & D.L. Garner.** 2002. Current status of sexing mammalian spermatozoa. *Reproduction* 124 : 733-743.
- Tappa, B., E.T. Margawati, N. Mulyaningsih, A. Soeksmanto & M. Suecha.** 1992. Sinkronisasi, superovulasi, dan transfer embrio segar dan embrio beku pada sapi pedaging. Prosiding Seminar Hasil Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi. Bogor. Hlm. 376 -386.
- Tappa, B., E.T. Margawati & E.M. Kaiin.** 1994. Kelahiran anak sapi perah dari sapi pedaging hasil transfer embrio. Prosiding Seminar Nasional Sains dan Teknologi Peternakan. Balitnak. Bogor. Hlm. 177-181.
- Toelihere, M.R.** 1993. Inseminasi Buatan pada Ternak. Angkasa, Bandung.